

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 486—492, September 1969

## Bestimmung von Korrekturfaktoren für die Farbstoff-Proteinbindung bei der Folien-Elektrophorese

### III. Mitteilung zur Methodik der Serumelektrophorese

Von V. BUSSE und H.-J. DULCE

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität im Klinikum Steglitz  
(Direktor: Professor Dr. H.-J. Dulce)

(Eingegangen am 26. März 1969)

Farbstoffbindungsuntersuchungen an denaturierten Proteinfractionen nach COHN mit ungereinigten und gereinigten Azofarbstoffen (Amidoschwarz 10 B, Neucoccin und Ponceau S) führen zu folgenden Ergebnissen:

1. Ungereinigte Farbstoffe werden nicht linear-proportional an Serumproteinfractionen gebunden.
  2. Gereinigte, einheitliche Farbstoffe werden linear-proportional an alle Proteinfractionen des Serums gebunden.
- Für Ponceau S, gereinigtes Amidoschwarz und Neucoccin wurde die Farbstoffbindung in mg pro 1 mg Protein bestimmt. Auf Grund dieser Werte errechneten wir Korrekturfaktoren für die Anfärbbarkeit der Serumproteinfractionen, die bei der photometrischen Auswertung der Celluloseacetat-Folien-Elektrophorese angewendet werden müssen. Wird Ponceau S verwendet, betragen die Faktoren für Albumin 1,0, für  $\alpha$ -Globulin 1,50, für  $\beta$ -Globulin 1,68 und für  $\gamma$ -Globulin 1,42. Mit Hilfe dieser Faktoren kann die Auswertung der Serumelektrophorese in der Routinediagnostik exakter und fehlerfreier erfolgen.

#### Determination of correction factors for protein-dye binding in strip electrophoresis

The binding of unpurified and purified azo dyes (amide black 10 B, neucoccin and ponceau S) to denatured protein fractions according to COHN was studied.

1. The proportional binding of unpurified dyes to serum protein fractions is non-linear.
  2. The proportional binding of purified, homogeneous dyes is linear for all serum protein fractions.
- The dye binding in mg per 1 mg protein was determined for ponceau S, purified amido black and neucoccin. From these values, correction factors were calculated for the intensity of serum protein fractions, which must be used in the photometric evaluation of cellulose acetate strip electrophoresis. With ponceau S, the factors are: albumin, 1.0;  $\alpha$ -globulin, 1.50;  $\beta$ -globulin, 1.68;  $\gamma$ -globulin, 1.42. The use of these factors permits a more exact and error-free evaluation of serum electrophoresis in routine diagnosis.

Seit der Einführung der Celluloseacetat-Folie durch J. KOHN (1, 2) ist die Zonenelektrophorese zu einem klassischen analytischen Verfahren der Proteinchemie geworden. Die Celluloseacetat-Folien-Elektrophorese hat der Papier-Elektrophorese gegenüber vor allem den Vorteil bedeutend kürzerer Trenndauer und leichter Auswertbarkeit (3). Inzwischen sind durch die Entwicklung guter Elektrophorese-Apparaturen (z. B. Shandon, Boskamp) die physikalisch-chemischen Trennbedingungen reproduzierbarer geworden. Fehler entstehen in der Regel erst bei der Auswertung der Folien, und zwar:

1. durch Verwendung von Farbstoffen, die von den aufgetrennten Proteinfractionen unterschiedlich gebunden werden (4—11).
2. durch Verwendung ungereinigter Farbstoffe, die zu einer unbeeinflussbaren Färbung des Folienuntergrundes führen und eine exakte stöchiometrische Beziehung bei der Bindung zwischen Farbstoff und Protein nicht mehr gewährleisten (3, 12).

Um diese Fehler bei der Auswertung ausschalten zu können, müssen gereinigte, einheitliche Farbstoffe verwandt (13) und die unterschiedliche Bindung der Farbstoffe an die Proteinfractionen durch Korrekturfaktoren ausgeglichen werden.

Für die Elektrophorese auf Filtrierpapier sind immer entsprechende Korrekturfaktoren vorgeschlagen worden. Tabelle 1 zeigt für die Farbstoffe Amidoschwarz 10 B und Ponceau S die errechneten Faktoren. Die Vielzahl der Angaben und die Verschiedenheit der Versuchsanordnungen, wie sie in der Pionierzeit der Elektrophorese noch bestanden, bedingen heute Unsicherheit über die Gültigkeit dieser Korrekturfaktoren.

Tab. 1  
Farbstoffkorrekturfaktoren für denaturierte Serumglobuline

Farbstoff	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin	Autor
Amidoschwarz 10 B	1,4	1,6	1,4	DITTMAR (7)
			1,46	DE JONG (14)
			1,4	GRASSMANN (4)
			1,1—2,9	KOIV und Mitarbeiter (15)
			1,6	PEZOLD (16)
			1,5	LÖFFLER (17)
Ponceau S	1,71	1,79	1,3	CASPARI (18)
	1,3	1,3	1,15	K. HEIDE (19)
	1,43	1,25		
	( $\alpha_1$ )	(+ $\alpha_2$ )		
			1,58	WEBSTER (6)

Neuere Arbeiten, die dem besonderen und unterschiedlichen Verhalten der Proteine auf Celluloseacetat-Folie Rechnung tragen, sind selten. Die Adsorption der Albumine an Celluloseacetat ist deutlich geringer als an Papier, während die Lipoproteide am Papier stärker als

an Celluloseacetat haften (20, 21). Korrekturfaktoren zum Ausgleich der unterschiedlichen Verteilung der Proteine pro  $\text{cm}^2$  sollen bei Celluloseacetat überflüssig sein (19). Nachdem GRASSMANN und HANNIG (5) die Transparenzphotometrie als Auswerteverfahren der Elektrophorese durchgesetzt hatten, wurden sogar Farbstoffkorrekturfaktoren für Amidoschwarz für unnötig erachtet (22, 23). Die Serienanalyse der Serum-Elektrophorese rückte in den Vordergrund. Untersuchungen der Bindung von gereinigten und ungereinigten Farbstoffen an Proteine zeigen aber, daß bei der Celluloseacetat-Folie Korrekturfaktoren nicht zu vernachlässigen sind, insbesondere nicht, wenn das Elutionsverfahren nach TURBA und ENENKEL (24) bei der Auswertung angewendet wird. Wir untersuchten die Bindung der Farbstoffe Amidoschwarz 10 B, Neucoccin und Ponceau S an Protein und ermittelten die Korrekturfaktoren für die Berechnung der Albumin-,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulinfraktionen. Amidoschwarz und Neucoccin wurden nach dem früher beschriebenen Verfahren gereinigt (25), Ponceau S als einheitlicher Farbstoff unmittelbar verwendet.

## Material und Methodik

Celluloseacetat-Folie, Sepraphore III, Camag, Berlin, Amidoschwarz 10 B, E. Merck, Darmstadt, Ponceau S, Serva, Heidelberg, Neucoccin, Agfa, Leverkusen, gereinigte Fraktion Amidoschwarz und Neucoccin (25), Human-Proteinfraktionen nach Cohn, Hyland-Travenol, München.

### Farbstofflösungen

Wir stellten Stammlösungen der einzelnen Farbstoffe her, indem 1 g des Farbstoffes in 1 l einer 1:1 (v/v) Mischung von 0,2N Oxalsäure und Methanol aufgelöst wurde. Aus dieser Stammlösung fertigten wir durch Zugabe von Oxalsäure: Methanol eine Verdünnungsreihe an. Die Messung der Extinktionen der einzelnen Eichwerte erfolgte im Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffs mit einem Eppendorf-Filter- oder Zeiss-Spektralphotometer. Bei allen Farbstoffen verlief die Eichkurve bis zu einer gemessenen Extinktion von 1,6 linear. Für spätere Berechnungen verwendeten wir deshalb den  $\text{tg } \alpha$  der Eichgeraden.

### Herstellung der Verdünnungsreihe von Human-Proteinfraktionen

Gefriergetrocknete COHNSche Human-Proteinfraktionen V (Albumin), IV—1 ( $\alpha$ -Globulin), III ( $\beta$ -Globulin) und II ( $\gamma$ -Globulin) wurden von einer Stammlösung ausgehend so verdünnt, daß der mittlere Eichwert der physiologischen Serumkonzentration entsprach. Diese Konzentration betrug für Albumin 40 g/l, für  $\alpha$ -Globulin 6,0 g/l, für  $\beta$ -Globulin 8,0 g/l und für  $\gamma$ -Globulin 12 g/l. Nur beim Albumin waren Konzentrationen von 40 g/l nicht einsetzbar, weil das Protein später beim Färben von der Folie abplatze. Wir setzten deshalb für Albumin eine Verdünnungsreihe von 5,0 bis 20,0 g/l an. Albumin und  $\gamma$ -Globulin lösten sich gut in 0,145M NaCl-Lösung,  $\alpha$ -Globulin besser in Veronalpuffer von pH 8,6 und  $\mu = 0,05$ .  $\beta$ -Globulin konnte in Veronalpuffer auch nach tagelangem Rühren nicht als klare Lösung erhalten werden, so daß es als Suspension eingesetzt werden mußte. Die einzelnen Eichwerte wurden auf eine feuchte, in einen Rahmen gespannte Celluloseacetat-Folie mit einer Präzisionspritze (Agla-Micrometer-Spritze der Firma Burroughs-Wellcome, London) aufgetragen. Das aufgetragene Volumen von 10  $\mu\text{l}$  wurde mit der Spritze auf eine Fläche von etwa 4  $\text{cm}^2$  fein verteilt, weil erst unterhalb einer Menge von 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nach SIMON (26) eine Linear-Proportionalität zwischen Proteinmenge und Farbstoffbindung zu erwarten ist. Nach Lufttrocknen kam der Streifen zum

Denaturieren der Proteine 30 Min. bei 100° in einen Trockenschrank. Anschließend erfolgte 30 Min. lang die Färbung mit einer der Farbstofflösungen (1 g/l). Durch vier Entfärbungsbäder (Methanol: 0,2N Oxalsäure 1:1 (v/v)), die 30 Min. dauerten, wurde der Untergrund der Celluloseacetat-Folie nahezu entfärbt. Die gefärbten Proteinzonen schnitten wir dann heraus, eluierten die Streifen 15 Min. in 1,5, 3,0 oder 10,0 ml einer ammoniakalischen Methanollösung (2N  $\text{NH}_4\text{OH}$ :Methanol 1:1 (v/v)) und werteten photometrisch bei 520 nm für Ponceau S, bei 509 nm für Neucoccin und bei 600 nm für Amidoschwarz aus. Die Elutionszeit darf nicht länger als 15 Min. betragen, da sonst die Folie angegriffen und aufgelöst wird. Wir führten für jede Konzentration 5 bis 6, im physiologischen Konzentrationsbereich 15 Einzelbestimmungen durch.

### Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte in der von J. KOHN (2) angegebenen Weise. Mit einem aus zwei dicht nebeneinanderliegenden Stahl-drähten bestehenden Applikator (Fa. Camag) wurden 3  $\mu\text{l}$  auf die pufferdurchtränkte Sepraphore-Folie aufgetragen und in der KOHNSchen Kammer (Fa. Shandon) aufgetrennt. Als Puffer diente Tris-Barbiturat-Lösung von pH 8,8 und 0,066M. Die Stromstärke betrug 1,5 bis 2 mA/Streifen, die Trenndauer 50 Minuten. Die Streifen wurden danach luftgetrocknet und im Trockenschrank bei 100° 30 Min. lang zwischen Glasplatten denaturiert und „gebügelt“. Anschließend färbten und eluierten wir die einzelnen Proteinbanden wie oben beschrieben.

## Ergebnisse

### Bindung von ungereinigten Azofarbstoffen an Proteine

Die Abbildungen 1—3 zeigen die Farbstoffbindung bei steigenden Proteinkonzentrationen. Die Proteinbindung von Ponceau S verläuft bei den Globulinen deutlich linear, während beim Albumin in hoher Konzentration diese Linearität nicht nachweisbar ist. Die Farbstoffe Neucoccin und Amidoschwarz binden sich nahezu linearproportional nur an Albumin und  $\gamma$ -Globulin, die Bindung an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin weicht schon im Bereich physiologischer Proteinkonzentrationen vom linearen Verlauf ab.

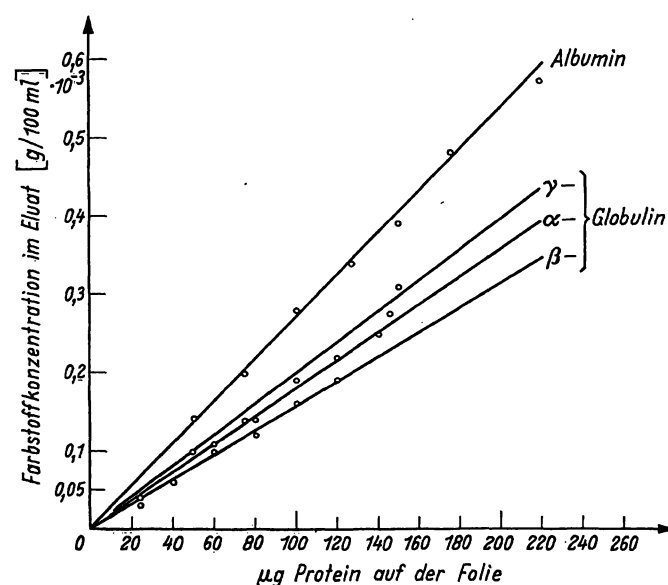


Abb. 1  
Bindung von Ponceau S an verschiedene auf die Folie aufgetragene Konzentrationen von Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Gemessen wurde die Farbstoffintensität in 10 ml Eluat und die Konzentration des gebundenen Farbstoffs in g/100 ml durch den  $\text{tg } \alpha$  der Farbstoffeichgeraden bestimmt.

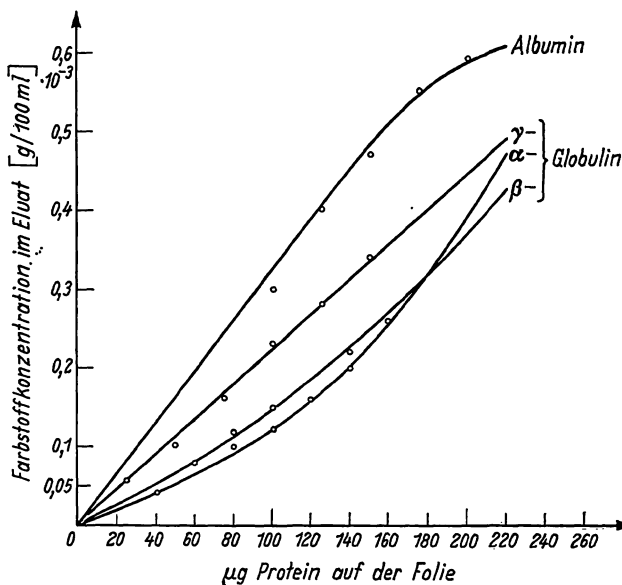


Abb. 2

Bindung von Neucoccin an verschiedene auf die Folie aufgetragene Konzentrationen von Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Gemessen wurde die Farbstoffintensität in 10 ml Eluat und die Konzentration des gebundenen Farbstoffs in g/100 ml durch den  $\text{tg} \alpha$  der Farbstoffeichgeraden bestimmt.

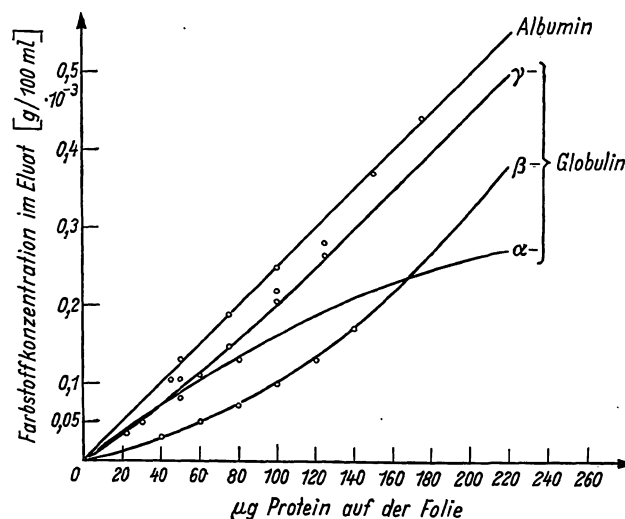


Abb. 3

Bindung von Amidoschwarz 10 B an verschiedene auf die Folie aufgetragene Konzentrationen von Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Gemessen wurde die Farbstoffintensität in 10 ml Eluat und die Konzentration des gebundenen Farbstoffs in g/100 ml durch den  $\text{tg} \alpha$  der Farbstoffeichgeraden bestimmt.

Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der Mittelwerte von Variationskoeffizienten der einzelnen Meßwerte, die nach der Formel  $V = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$  berechnet wurden ( $s$  = Standardabweichung,  $\bar{x}$  = Mittelwert).

Die minimale und maximale Streubreite der Einzelwerte zeigt die Unsicherheit der Auswertung bei Verwenden

Tab. 2

Mittelwerte von Variationskoeffizienten  $V$  (in %) der Meßwerte für die Protein-Farbstoffbindung unter Verwendung ungereinigter Farbstoffe.

Farbstoff	Albumin	$\alpha$ -	Globulin $\beta$ -	$\gamma$ -
Amidoschwarz	11,84	13,08	12,32	11,66
Neucoccin	6,65	6,92	6,9	6,4
Ponceau S	3,42	3,11	2,46	2,36

von ungereinigtem Neucoccin und Amidoschwarz, aber eine gute Zuverlässigkeit der Auswertung bei Verwenden von Ponceau S.

Die drei Farbstoffe besitzen für die vier Hauptproteinfraktionen ein größtenteils voneinander abweichendes Bindungsvermögen. Die Farbstoffbindung für 1 mg Protein läßt sich nach folgender Formel berechnen (Tab. 3):

$$E \cdot \text{tg} \alpha \cdot V_e^{-1} \cdot 100 \cdot \frac{1000}{[\text{Protein}]} \text{ mg Farbstoff}$$

( $E$  = Mittelwert der Extinktion eines Farbstoffbindungsmeßwertes,  $\text{tg} \alpha$  = Steigung der Farbstoff-Eichgeraden).

Tab. 3

Bindungsfähigkeit ungereinigter Azofarbstoffe an denaturierte Proteinfraktionen

1 mg Proteinfraktion	mg gebundener Farbstoff Amidoschwarz	Neucoccin	Ponceau S
Albumin	0,25	0,31	0,27
$\alpha$ -Globulin	0,17	0,14	0,18
$\beta$ -Globulin	0,096	0,13	0,16
$\gamma$ -Globulin	0,18	0,22	0,19

#### Bindung von gereinigten Azofarbstoffen an Proteine

Die Farbstoffbindungskurven zeigen gegenüber den Ergebnissen mit ungereinigten Farbstoffen eine auffallende Linearität. Bei den gereinigten Farbstoffen nimmt die Bindungsfähigkeit an Protein in der Reihenfolge Albumin,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ -Globulin ab (Tab. 4 u. 5).

Tab. 4

Mittelwerte von Variationskoeffizienten  $V$  (in %) der Meßwerte für die Protein-Farbstoffbindung unter Verwendung gereinigter Farbstoffe

Farbstoff	Albumin	$\alpha$ -	Globulin $\beta$ -	$\gamma$ -
Blau (Amidoschwarz)	3,24	4,32	4,2	1,37
Rot (Neucoccin)	1,82	1,39	3,91	4,13
Ponceau S	3,46	3,11	2,46	2,36

Tab. 5

Bindungsfähigkeit gereinigter Azofarbstoffe an denaturierte Proteinfraktionen

1 mg Proteinfraktion	mg gebundener Farbstoff Blau (Amidoschwarz)	Rot (Neucoccin)	Ponceau S
Albumin	0,32	0,35	0,27
$\alpha$ -Globulin	0,19	0,21	0,18
$\beta$ -Globulin	0,156	0,165	0,16
$\gamma$ -Globulin	0,21	0,24	0,19

Die Abnahme der minimalen und maximalen Streubreite, wie sie sich zahlenmäßig in der Abnahme der Variationskoeffizienten niederschlägt, gibt einen Eindruck von dem Vorteil der Verwendung gereinigter, einheitlicher Farbstoffe (Tab. 4).

Weiterhin ergab es sich, daß die mit gereinigten Farbstoffen angefärbten Folien bedeutend schneller entfärbt werden konnten als die mit ungereinigten Farbstoffen angefärbten Folien und der Folienuntergrund, besonders bei Verwendung von gereinigtem Amidoschwarz, frei von Farbrückständen ist. Da die Kurven für die Protein-Farbstoffbindung (Abb. 4 und 5) alle steiler und näher aneinander liegen, folgern wir, daß kaum noch wesent-

# Sartorius-Membranfolien — das ideale Trägermaterial für die Elektrophorese

In den vergangenen zwei Jahren wurde die Papierelektrophorese durch Sartorius-Celluloseacetatmembranen als neues Trägermaterial weitgehend ersetzt. Die mit der neuen Technik verbundenen Vorteile sind klar und überzeugend:

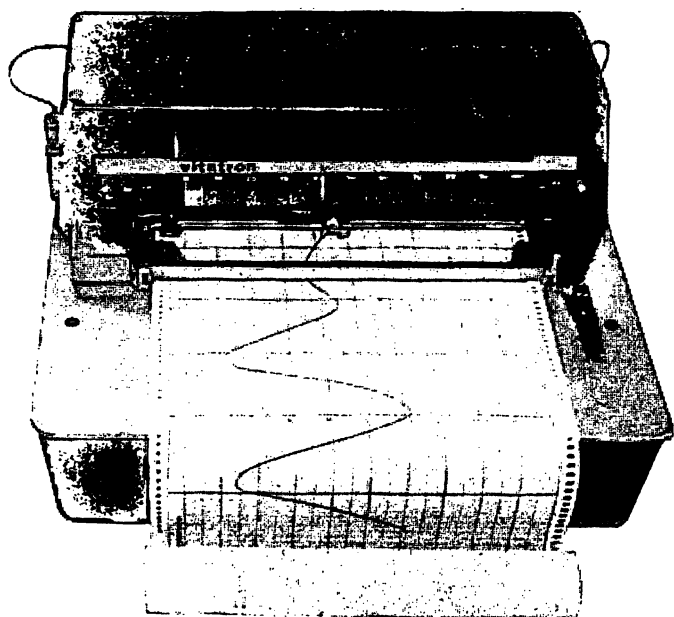
Wesentliche Verbesserung der routinemäßigen Serumeiweißelektrophorese. In kurzer Zeit ein hervorragendes Ergebnis. Klare Abtrennung der einzelnen Fraktionen. Keine Adsorption gegenüber Proteinen. Sartorius-Membranfilter lassen sich glasklar durchsichtig machen. Geringer Probemengenbedarf.

Ausführliche Informationen enthält unserer Handbuch SM 10 und unser neuester Sonderdruck von H. W. Perl und K. H. Voggel „Zur Standardisierung elektrophoretischer Trennverfahren auf Celluloseacetatmembranen“. Wir senden sie Ihnen auf Wunsch gern zu. Sie brauchen uns nur zu schreiben.

Bitte besuchen Sie uns auf dem VII. Internationalen Kongreß für Klinische Chemie in Genf, Kongreßhalle, Stand L 4.



SARTORIUS-MEMBRANFILTER GmbH · D-34 Göttingen · Weender Landstr. 96—102  
Telefon 0551/31031 · Telex 096830



Das abgebildete Gerät kostet als LIN-Schreiber DM 1995,— plus Mehrwertsteuer, in LIN/LOG-Form DM 2815,— plus Mehrwertsteuer.



Wir sind sicher:

## VITATRON FLACHBLATTSCHEIBER

mit 8 Papiergeschwindigkeiten gehören zu den preiswertesten, die Sie bekommen können.

Den LIN-Schreiber mit Integrationsvorrichtung liefern wir für DM 3425,— plus Mehrwertsteuer und den LIN/LOG-Schreiber mit Integrator für DM 4215,— plus Mehrwertsteuer. Bei diesen Preisen lohnt es sich einfach nicht, sich mit Schreiberproblemen herumzuschlagen. Lassen Sie sich die Geräte in Ihrem Hause von unseren Mitarbeitern vorführen! Denn alle Vorteile und Möglichkeiten können wir hier nicht aufzählen. Gern senden wir Ihnen vorab auch nähere Informationen. Unsere Service-Station ist in Ihrer Nähe.

**vitatron**

Vitatron GmbH  
5024 Pulheim, Postfach 9 · Ruf: Stommeln 02238/7312

# BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE

(„Berichte der Gesellschaft für biologische Chemie“)

Unter Mitwirkung des  
„CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE“  
(National-Centrum für wissenschaftliche Forschung) veröffentlicht

R. PERLÈS  
Hilfs-Generalsekretär

J. E. COURTOIS  
Generalsekretär

Y. RAOUL  
Hauptredakteur

*Sekretariat und Redaktion*  
4, avenue de l'Observatoire, Paris (6°)

Herausgeber:  
MASSON et CIE, 120, Boulevard Saint-Germain, Paris (6°)

Der „BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“ veröffentlicht jährlich 11 Hefte; diese enthalten die Arbeiten der französischen Biochemiker, welche der „SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“ (Gesellschaft für biologische Chemie) angehören.

*Abonnementspreis 1969:*  
Frankreich und „Franc-Zone“ . . . . 150 francs  
Belgien . . . . . 1684 belges  
Andere Länder . . . . . 165 francs

## NEU für die Säulenchromatographie

### Aluminiumoxid W 200 - aktivitätskonstant

Ein voll standardisiertes Aluminiumoxid,  
das durch kein anderes zu ersetzen ist.  
Wir garantieren  
für alle drei Formen  
basisch, neutral und sauer  
Konstanz der Ausgangsaktivität  
Konstanz bei der Desaktivierung  
Konstanz bei Trennungen

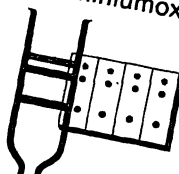


Aluminiumoxid W 200 wird immer völlig  
gleichbleibend gefertigt. Daher lohnt es  
sich, alle Trennverfahren auf Aluminium-  
oxid W 200 umzustellen.

Erstmalig sind Ausgangsaktivität, Des-  
aktivierungsverhalten und innere Ober-  
fläche bei allen drei Formen gleich.  
Endlich sind Sie bei der Chromatographie  
vor Überraschungen sicher.

Erstaunt sein werden Sie jedoch darüber,  
wie wenig Sie für dieses neue Produkt  
bezahlen.

Aluminiumoxid W 200 basisch  
Aluminiumoxid W 200 neutral  
Aluminiumoxid W 200 sauer



erhalten Sie bei  
**M. Woelm**  
344 Eschwege  
Postfach 840  
Informationen auf Anfrage

# Die Injektion

## Technik — Praxis — Komplikationen

Von Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. **Joachim Gabka**

Groß-Oktav. VII, 205 Seiten. Mit 73, z. T. mehrfarbigen Abbildungen. 1968. Plastik flexibel DM 20,—

Die vorliegende Monographie stellt die Technik, Praxis, Komplikationen und juristischen Konsequenzen der Injektionstechnik (intravenös, intramuskulär, subkutan und intrakutan sowie intraarteriell) dar. Nach einer historischen Einleitung findet man zuverlässige Angaben über die Topographie, die apparativen Hilfsmittel, technische Fehler, Nebenwirkungen bestimmter Arzneimittel, die Sterilisation und Desinfektion und die rechtliche Situation. Die speziellen Verhältnisse bei Säuglingen und Kindern sind berücksichtigt. Leitsätze werden besonders hervorgehoben und sehr gute Abbildungen ergänzen den Text. Auch ein Schrifttumsverzeichnis fehlt nicht. Außerordentlich wichtig ist die Feststellung, das der Arzt die

Injektionen nicht nur kunstgerecht ausführen muß, sondern auch die Folgen zu übersehen hat; er muß ferner das einschlägige Schrifttum kennen (Gerichtsurteile in der DBR). Jeder Zwischenfall ist sofort sorgfältig zu protokollieren.

Die Darstellung des Gebietes ist aus mehreren Gründen beachtenswert. Sie vermittelt präzise Kenntnisse auch der modernen Technik, sie zeigt, wie einem scheinbar sterilen Gebiet noch immer wissenschaftliche und praktische Aspekte abzugewinnen sind und nicht zuletzt zeugt sie davon, daß universelle Kenntnisse (s. historische Einleitung, für die Beschreibung eines atrophischen Hinterbeins wird kein geringerer als Horaz bemüht) einen letztlich spröden Stoff beleben können.

*Kinderärztliche Praxis*



Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

# NEU IN DER DC

Wir stellen vor:

## vier neue Kieselgele Woelm DC

hervorragende Trennung  
konstante  $R_F$ -Werte  
bessere Ergebnisse

Kieselgel Woelm DC    Kieselgel G Woelm DC  
Kieselgel F Woelm DC    Kieselgel GF Woelm DC

Informationen und Preisliste  
senden wir Ihnen auf Anfrage

M. Woelm  
344 Eschwege  
Postfach 840

Pschyrembel

# Klinisches Wörterbuch

Mit klinischen Syndromen

von Prof. Dr. med. Dr. phil. W. PSCHYREMBEL

Gegr. von OTTO DORNBLÜTH

185.—250., neubearbeitete und erweiterte Auflage

Oktav. Mit 2275 Abbildungen. XVI, 1348 Seiten.

1969. Ganzleinen DM 28,—

Man wird kaum ein besseres klinisches Wörterbuch als den Pschyrembel finden, das so schnell, zuverlässig und vollständig orientiert, wie dieses altbewährte Nachschlagewerk.

*Die Berliner Ärztekammer*

In der vorliegenden Auflage des allbekannten „Pschyrembel“ ist auch ein Werk zu begrüßen, das weit über den Rahmen einer Terminologie medizinischer Begriffe hinausgewachsen ist. Neben allen klinischen Fächern umfaßt es nämlich auch wichtigste Begriffe aus der Pharmakologie, der klinischen Chemie, Mikrobiologie, Endokrinologie, Humangenetik, sowie auch die aus dem nuklearmedizinischen Bereich. Es informiert so kurz und so präzise wie möglich auch über die neueste Entwicklung und den Aussagewert klinischer Untersuchungs- und Arbeitsmethoden. Zahlreiche, meistens gelungene photographische Abbildungen und anschauliche Tabellen und Schemata vertiefen das Verständnis einzelner Begriffe.

*Parfümerie und Kosmetik*

Auch im nuklearmedizinischen Bereich wurde das Fachgebiet der Radiologie vollständig neu bearbeitet und damit den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen und technischen Neuerungen angepaßt.

*Deutsche Hebammen-Zeitschrift*



---

Walter de Gruyter & Co. · Berlin 30

---

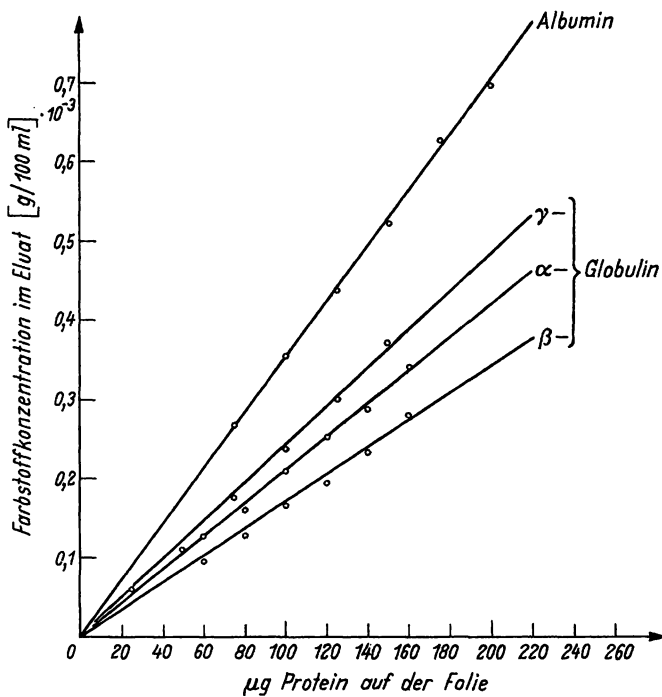


Abb. 4

Bindung von gereinigtem Amidoblau 10 B an verschiedene auf die Folie aufgetragene Konzentrationen von Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Gemessen wurde die Farbstoffintensität in 10 ml Eluat und die Konzentration des gebundenen Farbstoffs in g/100 ml durch den  $\text{tg} \alpha$  der Farbstoffeichgeraden bestimmt.

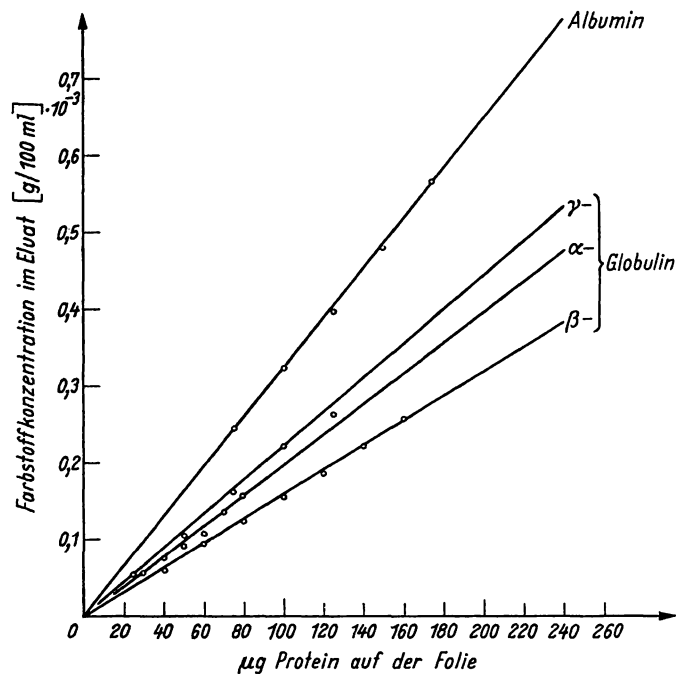


Abb. 5

Bindung von gereinigtem Neucoccin an verschiedene auf die Folie aufgetragene Konzentrationen von Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin. Gemessen wurde die Farbstoffintensität in 10 ml Eluat und die Konzentration des gebundenen Farbstoffs in g/100 ml durch den  $\text{tg} \alpha$  der Farbstoffeichgeraden bestimmt.

liche Unterschiede in der Bindungsfähigkeit einer Proteinfraction für den einen oder anderen gereinigten Farbstoff bestehen. Die verstärkte Farbstoffbindung an die Proteine verdeutlicht die Berechnung der Farbstoffbindung pro 1 mg Protein (s. Tab. 5, vgl. Tab. 3).

#### Berechnung der Korrekturfaktoren

Die Korrekturfaktoren wurden aus dem Quotienten mg gebundener Farbstoff/mg Protein errechnet. Die Farbstoffbindung an Albumin setzten wir als 1 an und dividierten die Quotienten für Albumin nacheinander durch die Quotienten der Globuline. Auf diese Weise ergaben sich die Korrekturfaktoren für die Globuline (Tab. 6), mit denen die Extinktionen der eluierten, gefärbten Proteinfractionen vor der Berechnung der Extinktionsprozente multipliziert werden müssen.

Tab. 6  
Korrekturfaktoren für Serumglobuline bei Verwenden gereinigter, einheitlicher Azofarbstoffe zur Anfärbung

Farbstoff	Albumin	Globuline		
		$\alpha$ -	$\beta$ -	$\gamma$ -
Blau (Amidoschwarz)	1	1,68	2,05	1,52
Rot (Neucoccin)	1	1,66	2,12	1,45
Ponceau S	1	1,50	1,68	1,42

#### Richtigkeit der Korrekturfaktoren

Zum Überprüfen der Richtigkeit der errechneten Korrekturfaktoren wurde ein künstliches Serum hergestellt, in dem die vier COHN'schen Fraktionen zusammen in Veronalpuffer (pH 8,6) in physiologischer Konzentration gelöst wurden. Anschließend führten wir

Tab. 7

a) Elektrophorese von künstlichem Serum unter Anfärbung mit gereinigten Farbstoffen und Berechnung ohne Korrekturfaktoren (wiedergegeben sind die Mittelwerte von sieben Einzelbestimmungen). Extinktionen für die ermittelten Fraktionen in % der Gesamtextinktion für das Serum.

Farbstoff	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin
Protein	Albumin	Albumin	$\alpha$ -Globulin	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin
Ext. % gefunden	75,36	75,48	8,44	8,22	7,46	6,73	8,73	9,56
Ext. % theoretisch	63,32		12,38		12,7		11,59	

b) Elektrophorese von künstlichem Serum unter Anfärbung mit gereinigten Farbstoffen und Berechnung mit Korrekturfaktoren. Extinktionen für die ermittelten Fraktionen in % der Gesamtextinktion für das Serum

Farbstoff	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin
Protein	Albumin	Albumin	$\alpha$ -Globulin	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin
Ext. % gefunden	63,73	64,2	12,09	11,73	12,87	12,02	11,27	12,03
Ext. % theoretisch	63,32		12,38		12,7		11,59	



Tab. 8

a) Serumelektrophorese: Berechnung ohne Korrekturfaktoren und Anfärbung mit ungereinigten Farbstoffen (wiedergegeben sind die Mittelwerte von 10 verschiedenen Seren). Extinktionen für die ermittelten Fraktionen in % der Gesamtextinktion für das Serum

Farbstoff	Amidoschwarz	Neucoccin	Amidoschwarz	Neucoccin	Amidoschwarz	Neucoccin	Amidoschwarz	Neucoccin
Protein	Albumin	Albumin	$\alpha$ -Globulin	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin
Ext. %	68,9	71,34	10,23	11,28	4,47	5,37	16,38	12,89

b) Serumelektrophorese: Berechnung ohne Korrekturfaktoren und Anfärbung mit gereinigten Farbstoffen. Extinktionen für die ermittelten Fraktionen in % der Gesamtextinktion für das Serum

Farbstoff	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S
Protein	Albumin	Albumin	Albumin	$\alpha$ -Glob.	$\alpha$ -Glob.	$\alpha$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.
Ext. %	66,15	72,66	66,68	11,36	8,61	10,35	9,05	7,38	9,07	13,44	11,35	13,90

c) Serumelektrophorese: Berechnung mit Korrekturfaktoren und Anfärbung mit gereinigten Farbstoffen. Wiedergegeben sind die Mittelwerte von 10 verschiedenen Normalseren. Extinktionen für die ermittelten Fraktionen in % der Gesamtextinktion für das Serum

Farbstoff	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S	Blau Amidoschwarz	Rot Neucoccin	Ponceau S
Protein	Albumin	Albumin	Albumin	$\alpha$ -Glob.	$\alpha$ -Glob.	$\alpha$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\beta$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.	$\gamma$ -Glob.
Ext. %	53,3	60,3	54,32	15,27	12,1	14,94	15,0	12,97	14,16	16,4	14,06	16,57

eine Serum-Elektrophorese durch. Die Extinktionen der Eluate wurden gemessen, mit den Korrekturfaktoren multipliziert und in Extinktionsprozente umgerechnet. Wir erhielten auf diese Weise Proteinanteile, die gut mit der bekannten Zusammensetzung des Serums übereinstimmten. Ohne Korrekturfaktoren ergaben sich erwartungsgemäß für Albumin zu hohe und für die Globuline zu niedrige Werte (Tab. 7).

#### Praktische Anwendung der Korrekturfaktoren

Die praktische Anwendung der Korrekturfaktoren erfolgte bei der Auswertung von Serum-Elektrophoresen gesunder Normalpersonen (Tab. 8). Unterbleibt eine Korrektur, fallen die Werte für die Albumine sowohl bei Verwendung gereinigter als auch ungereinigter Farbstoffe zu hoch aus, während sich besonders bei  $\beta$ -Globulinen, teilweise auch bei  $\gamma$ -Globulinen zu niedrige Werte ergeben (Tab. 8).

#### Besprechung der Ergebnisse

Werden alle physikalisch-chemischen Bedingungen bei der elektrophoretischen Auftrennung von Serumproteinen konstant gehalten, ist der Färbeprozess der einzige kritische Schritt bei der quantitativen Elektrophorese. Die Farbstoff-Proteinbindung steht dabei im Vordergrund. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine einwandfreie Reproduzierbarkeit des Verfahrens erst gewährleistet ist, wenn einheitliche Farbstoffe verwandt und die gemessenen Extinktionswerte entsprechend dem unterschiedlichen Farbstoffbindungsvermögen korrigiert werden.

Gereinigte Azofarbstoffe binden sich an die vier untersuchten Proteinfractionen relativ gleichmäßig. Im Vergleich zu ungereinigten Farbstoffen besteht eine ausgesprochene Linearität der Farbstoff-Proteinbindung, die von einigen Autoren nicht (4, 8, 27), für Ponceau S von WEBSTER (6) jedoch bestätigt wurde. Außerdem nimmt die Farbstoffbindung der einzelnen Proteinfractionen in

der Reihenfolge: Albumin,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ -Globulin ab, wenn die Eichkurven mit einheitlichen Farbstoffen ausgeführt werden. Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren muß unvollständig bleiben, da meistens nur die Farbstoffbindung von Albumin und  $\gamma$ -Globulin untersucht wurden. Lediglich GRASSMANN und HANNIG (4) zeigen unter Verwendung von Filtrierpapier ein Diagramm, wonach die Farbstoffbindung in der Reihenfolge Albumin,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -,  $\beta$ -Globulin abnimmt. SCHEIFFARTH und Mitarbeiter fanden, daß eine gleichmäßige Anfärbung der Proteine am besten mit Amidoschwarz zu erzielen sei (23), und MEULEMANS (28), daß Ponceau S gleich gut von Albumin und Globulinen gebunden wird. Diese erheblichen Unterschiede sind vorerst nicht zu erklären. Selten findet man in der Literatur vollständige Angaben über die Farbstoffbindung der Proteinfractionen. GRASSMANN und HANNIG (4) geben als Bindung für Amidoschwarz etwa 0,4 mg/mg Albumin und etwa 0,5 mg/mg  $\gamma$ -Globulin an. Diese Näherungswerte liegen für Albumin wenig, für  $\gamma$ -Globulin jedoch um mehr als das Doppelte höher als unsere Ergebnisse. Dagegen decken sich die Werte, die von PEZOLD und PEISER (16) für Albumin und  $\gamma$ -Globulin bei Amidoschwarz-Anfärbung angegeben sind, sehr gut mit den unseren, wenn zum Vergleich die Bindungsfähigkeit gereinigter Farbstoffe herangezogen wird. Ergebnisse, die mit anderen Farbstoffen, z. B. Bromphenolblau (9) oder Lissamingrün (8) erzielt wurden, weichen im Prinzip nicht stark von unseren Resultaten ab. Mit Ausnahme von GRASSMANN und HANNIG beschreiben alle übrigen Autoren eine Abnahme der Farbstoffbindung für  $\gamma$ -Globulin im Vergleich zu Albumin.

Die Berechnung der absoluten Konzentration von Proteinfractionen im Serum aus Extinktionsprozenten und Gesamtprotein ohne Korrektur ist ein häufig geübter Fehler, wie die Arbeit von LAUE (29) zeigt. Erst die Kenntnis von der Verschiedenheit der Farbstoffbindung und die Verwendung von Korrekturfaktoren ermöglichen eine genaue Berechnung der absoluten Mengen der Proteinfractionen aus dem Gesamteiweiß. Die Er-

Tab. 9  
Proteinfractionierung von menschlichem Normalserum durch Celluloseacetat-Folien-Elektrophorese

Albumin Ext. %	$\alpha$ - Ext. %	Globuline $\beta$ - Ext. %	$\gamma$ - Ext. %	Farbstoff	Autor
58,3	13,9	11,1	16,7	Ponceau S CAF	WEBSTER (6)
59,6	13,6	11,9	14,8	Ponceau S CAF	KAPLAN (32)
56,1	15,1	13,8	16,0	Amidoschwarz CAF	FRIEDMAN (33)
58,6	15,12	10,82	15,34	Amidoschwarz CAF	GIOVANELLI (34)
64,0	11,8	10,6	13,6	Ponceau S CAF	KOHN (2)
53,3	15,27	15,0	16,4	Blau (Amidoschwarz) CAF	eigene Werte
54,32	14,94	14,16	16,57	Ponceau S CAF	eigene Werte
56,5	14,2	15,2	14,2	freie Elektrophorese n. Tiselius	COHEN (35)

rechnung der Korrekturfaktoren und ihre Anwendung können aber nur sinnvoll sein, wenn zwischen Proteinkonzentration und Farbstoffbindung eine lineare Abhängigkeit besteht. Diese Linearität gilt für die gereinigten Farbstoffe Blau aus Amidoschwarz und Rot aus Neucoccin sowie für Ponceau S. Auf das Errechnen der Faktoren für die ungereinigten Farbstoffe verzichteten wir.

Alle Ergebnisse sind mit derselben Charge von Proteinfractionen erzielt worden. Mit Absicht wurden die COHN'schen Fraktionen V, IV-1, III und II ausgewählt, nachdem sich bei Testung in der Elektrophorese gezeigt hatte, daß diese Fraktionen als repräsentativ für die in der normalen Serum-Elektrophorese vorkommenden Proteingruppen angesehen werden können (vgl. Tab. 7 und Tab. 8c). Deshalb gelten die aufgestellten Korrekturfaktoren jeweils für die Gruppe der Proteine, die mit gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit erfaßt werden.

Wie die meisten anderen Autoren arbeiteten auch wir mit denaturierten Proteinen. Die Auswertung von Elektropherogrammen erfordert eine gute Fixierung der aufgetrennten Proteinbanden, die durch Behandeln mit sauren Farbstoffen und/oder Hitzedenaturierung erreicht wird. Das so veränderte Proteinmolekül verhält sich anders als ein natives Proteinmolekül, ganz besonders hinsichtlich seiner Farbstoffbindungsfähigkeit (30). Insofern beziehen sich die Angaben über Farbstoffbindung nur auf denaturierte Proteine. Die Richtigkeit der vergleichenden analytischen Aussage wird dadurch nicht berührt.

Es stellt sich dabei die Frage, warum das kleine Albumin-Molekül pro mg mehr Farbstoff zu binden vermag, als das große  $\gamma$ -Globulin-Molekül. Denkbar wäre, daß beim Denaturieren der Proteine ein kleineres Molekül sich eher in seiner Peptidstruktur verändern und entfalten läßt als ein großes, wobei die basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin, die für die Reaktion mit den Sulfogruppen der Azofarbstoffe verantwortlich

sind (8), vermehrt an die Oberfläche gekehrt werden. Daß die Farbstoffmoleküle selbst auf der Folie polymerisieren können, wurde nach Untersuchungen von VICKERSTAFF (31) nicht bestätigt.

Im Wiederfindungstest unter Einsatz eines künstlichen Serums, bei dem exakt eingewogene Proteinmengen vorgegeben waren, gelang der Nachweis, daß die Serum-Elektrophorese eine richtig arbeitende Methode ist (Tab. 7). Allerdings sind die Verwendung gereinigter Farbstoffe und die Korrektur der gefundenen Extinktionsprozente Voraussetzung für gute quantitative Angaben.

Vergleicht man normale Serum-Elektrophorese-Werte anderer Autoren (Tab. 9) mit den eigenen (Tab. 8c), so fällt auf, daß unsere  $\beta$ -Globulinwerte (mit etwa 15 Extinktionsprozente) besonders hoch und die Albuminwerte niedrig liegen. Der Korrekturfaktor bei den  $\beta$ -Globulinen, die Lipoproteide enthalten, ist doppelt so groß wie der des Albumins. Andererseits entsprechen unsere, nach Korrektur der Extinktionen, erhaltenen Normalwerte für Serumproteinfractionen relativ gut den Ergebnissen von COHEN (35), die er mit der trägerfreien Elektrophorese nach TISELIUS erhielt. Diesem Verfahren haften die Fehler der Zonenelektrophorese auf Papier oder Celluloseacetat nicht an. Lipide der  $\beta$ -Proteinfractionen sind in beiden Fällen miterfaßt.

Es wäre in der Routinediagnostik wünschenswert, wenn die Methodik der Serum-Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folie durch Korrekturfaktoren und Verwendung gereinigter oder von vornherein einheitlicher Farbstoffe für einen weiten Bereich standardisiert und für verschiedene Untersucher vergleichbar gemacht werden könnte. Empfehlenswert wäre, Ponceau S zu verwenden, da hier die Korrekturfaktoren für die Globuline nur wenig voneinander abweichen.

Herrn Dr. J. BARROLIER (Schering AG, Berlin) habe ich für viele anregende Diskussionen und Frau R. LEWECKI für ihre gewissenhafte und fleißige Mitarbeit zu danken.

### Literatur

1. KOHN, J., *Biochem. J.* 65, 9 (1957). — 2. ders., *Clin. Chim. Acta* (Amsterdam) 2, 297 (1957). — 3. ders., *Ärzt. Laborat.* 10, 223 (1964) und 10, 269 (1964). — 4. GRASSMANN, W. und K. HANNIG, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 290, 1 (1952). — 5.

dieselben, *Klin. Wschr.* 35, 838 (1954). — 6. WEBSTER, D., *Clin. Chim. Acta* (Amsterdam) 11, 101 (1965). — 7. DITTMAR, A., *Papierelektrophorese*, S. 84, G. Fischer Verlag, Jena (1961). — 8. OSBORN, D. A., *Clin. Chim. Acta* (Amsterdam) 5, 777 (1960). —

9. JENCKS, W. P., M. R. JETTONAND und E. L. DURRUM, *Biochem. J.* 60, 205 (1955). — 10. CREMER, H. D. und A. TISELIUS, *Biochem. Z.* 320, 273 (1950). — 11. MASOPUST, J. und J. HOMOLKA, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 5, 464 (1960). — 12. BUSSE, V., *diese Z.* 6, 273 (1968). — 13. KAWERAU, E., *Analyst* 79, 681 (1954). — 14. DE JONG, E. B. M., *Rec. trav. chim.* 74, 1290 (1955). — 15. KORW, E., G. WALLENUS und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 4, 47 (1952). — 16. PEZOLD, F. A. und U. PEISER, *Klin. Wschr.* 31, 982 (1953). — 17. LÖFFLER, W. und C. WUNDERLY, *J. clin. Pathol. (London)* 6, 282 (1953). — 18. CASPARI, R. und M. MAGISTRETTI, *Plasma* 2, 1 (1959). — 19. HEIDE, K. und H. BIEL, *Behringwerk-Mitteilg.* 35, 75 (1958). — 20. PIEPER, J., *Klin. Wschr.* 39, 1293 (1961). — 21. LUBRAN, M., *J. Amer. Med. Ass.* 197, 360 (1966). — 22. SOMMERFELT, S. C., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 5, 105 (1953). — 23. SCHEIFFARTH, F., G. BERG und H. GÖTZ, *Papierelektrophorese in Klinik und Praxis*, S. 8, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin (1962). — 24. TURBA, F. und A. J. ENENKEL, *Naturwissenschaften* 37, 93 (1950). — 25. BUSSE, V., *diese Z.* 7, 239 (1969). — 26. SIMON, K., *Zschr. ges. inn. Med.* 12, 113 (1957). — 27. SCARDI, V. und V. BONAVITA, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 4, 322 (1959). — 28. MEULEMANS, O., *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 5, 614 (1960). — 29. LAUE, D., *Internist* 4, 521 (1963). — 30. MAHLER, H. R. und E. H. CORDES, *Biological Chemistry*, Harper International Edition, New York (1968). — 31. VICKERSTAFF, T., *Physical Chemistry of Dyeing*, Oliver and Boyd, London (1950). — 32. KAPLAN, A. und J. SAVOY, *Clin. Chem. (New York)* 11, 937 (1965). — 33. FRIEDMAN, H. S., *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 6, 775 (1961). — 34. GIOVANELLI, E., *Minerva Med. (Torino)* 51, 1946 (1966). — 35. COHEN, P. P., F. L. THOMPSON und G. A. NITSCHKE JR., *J. Clin. Invest.* 26, 820 (1947).

Dr. Volker Busse  
Chirurg. Universitätsklinik  
1 Berlin 19  
Spandauer Damm 130